

LC-MS 分析当归六黄汤中主要成分

黄明军¹, 孙耀志², 高松², 周海艳³

(1. 河南中医药大学, 郑州 450000; 2. 仲景宛西制药股份有限公司, 郑州 450000;
3. 北京大学 中医药现代研究中心, 北京 100191)

[摘要] **目的:**建立当归六黄汤的 HPLC 指纹图谱分析方法,对色谱数据进行分析,并建立高效液相-质谱(LC-MS)法分析当归六黄汤剂中主要成分。**方法:**HPLC 采用 Agela Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),流动相乙腈(A)-0.3% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~15% A; 10~15 min, 15%~20% A; 15~35 min, 20%~25% A; 35~50 min, 25%~31% A; 50~62 min, 31%~55% A; 62~70 min, 55%~60% A; 70~75 min, 60%~70% A),柱温 30 ℃,体积流量 0.8 mL·min⁻¹;质谱采用电喷雾离子源,正负离子模式下全扫描检测,并通过[M-H]⁻, [M+H]⁺等离子信息推断化合物。**结果:**建立当归六黄汤剂的 HPLC 分析方法及指纹图谱,并建立当归六黄汤剂的 LC-MS 图谱,指认汤剂中主要的 19 个特征色谱峰。**结论:**当归六黄汤 HPLC 指纹图谱分析方法稳定可靠,具有较好的重复性;通过建立 LC-MS 图谱,更加有效的指认了当归六黄汤剂中的主要成分。

[关键词] 当归六黄汤; 指纹图谱; 高效液相-质谱图谱; 主要成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0063-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090063

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160314.1605.010.html>

[网络出版时间] 2016-03-14 16:05

Analysis of Main Components in Danggui Liuhuang Tang Based on LC-MS

HUANG Ming-jun¹, SUN Yao-zhi², GAO Song², ZHOU Hai-yan³

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China;
2. Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co. Ltd., Zhengzhou 450000, China;
3. Modern Research Center of TCM, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Danggui Liuhuang Tang, analyze chromatographic data and analyze main components in Danggui Liuhuang Tang by high performance liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) method. **Method:** HPLC was used on Agela Venusil XBP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) column, with acetonitrile (A) -0.3% formic acid (B) as mobile phase for gradient elution (0-10 min, 5%-15% A; 10-15 min, 15%-20% A; 15-35 min, 20%-25% A; 35-50 min, 25%-31% A; 50-62 min, 31%-55% A; 62-70 min, 55%-60% A; 70-75 min, 60%-70% A); with column temperature of 30 ℃, and volume flow rate of 0.8 mL·min⁻¹; electrospray ionization was used for mass spectrometry, and full scan testing was done under cationic-anionic mode. Compounds were estimated through [M-H]⁻, [M+H]⁺ plasma information. **Result:** HPLC analysis and fingerprint were established for Danggui Liuhuang Tang; LC-MS spectra were established for Danggui Liuhuang Tang; 19 characteristic chromatographic peaks of the Tang were identified. **Conclusion:** HPLC fingerprint analysis method of the Danggui Liuhuang Tang is stable and reliable, with good repeatability; the main components of Danggui Liuhuang Tang can be effectively identified through the establishment of LC-MS spectra.

[Key words] Danggui Liuhuang Tang; LC-MS spectrum; main components

[收稿日期] 20151210(003)

[第一作者] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09508105)

[第一作者] 黄明军, 硕士, 从事中药新药研发, Tel: 18737115673, E-mail: mingjunhuang@126.com

当归六黄汤出自金·李杲《兰室秘藏》卷下自汗门方,原方记载:当归,地黄,熟地黄,黄芩,黄柏,黄连各等分,黄芪加倍,上药为粗末,每服五钱,水二盏,煎至一盏,食前服。具有滋阴泻火、固表止汗作用,主治阴虚火旺盗汗,被誉为“治盗汗之圣方也”。

当归六黄汤在临床上具有广泛的应用,傅晓芸^[1] 临床使用当归六黄汤治疗甲状腺功能亢进,周铭^[2] 使用当归六黄汤加减治疗甲亢;如今,人们将当归六黄汤与硫脲类化合物联合应用于甲亢的治疗,取得了较好的疗效^[3-5]。张伯兴等^[6] 观察当归六黄汤对治疗原发性干燥综合征有一定疗效,李德伟^[7] 观察服用加味当归六黄汤水煎剂对白塞病病人有良好效果。综合历代各家对当归六黄汤的论述,以及古今基础和临床对当归六黄汤的研究,凡内分泌失调,神经衰弱,糖尿病,甲状腺机能亢进等临床表现符合阴虚阳热证者,皆可以此方为基础方加减对症治疗。

当归六黄汤为临床疗效确切的经方、验方,此方药在临床应用中多由医院代煎或者由患者根据医嘱自己煎煮服用,由于医院煎药仪器的不同或者个人煎药习惯的不同,从而造成煎煮汤剂出现很大差异,而汤剂煎煮作为中药应用于临床的最终环节,其正

确与否,直接关乎中药的疗效与用药安全。目前,当归六黄汤汤剂的研究尚处于初级阶段,由于中药材质量的不稳定性及不可控性,应建立完善全面的质量保证体系确保当归六黄汤质量的稳定,因此本实验采用 LC-MS 技术建立了当归六黄汤汤剂的分析方法,对部分成分进行了指认,为全面评价当归六黄汤的质量奠定了基础。

1 材料

1200 型高效液相色谱-6300 Series Ion Trap 型 LC-MS(美国 Agilent),BSA124s 型 1/1 万电子天平(Sartorius,Max 120 g),KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),分体式全自动微电脑陶瓷锅。

黄芩苷、小檗碱、表小檗碱、汉黄芩苷、巴马汀、黄柏碱、千层纸素 A 苷、黄连碱对照品均购自中国食品药品检定研究院(批号分别为 110715-201318, 110713-201212, 110714-201303, 111514-201304, 110732-200907, 111895-201303, 110743-201107, 110706-201208)。

乙腈色谱纯,95% 乙醇、甲醇、甲酸为分析纯,水为去离子水。当归六黄汤方剂中七味中药材均为仲景宛西制药股份有限公司提供,且含量均合格。见表 1。

表 1 10 批标准汤剂药材基本信息

Table 1 Ten batch of basic information of standard decoction of medicinal materials

No.	当归	地黄	熟地黄	黄芩	黄连	黄柏	黄芪
1	甘肃 140927	河南 14092703	陕西 SX-3	内蒙古 141106	四川 140903	四川 141118	内蒙古 20140508
2	汇川 141005	河南 141107	河南 HN-3	北京 141118	重庆 141105	四川 141112	内蒙古 20140310
3	岷县 141003	山西 141110	河南 HN-4	内蒙古 141104	重庆 141107	四川 14092702	内蒙古 20140506
4	甘肃 GS-3	山西 141109	河南 HN-2	山西 141104	四川 141118	贵州 141113	内蒙古 141020
5	甘肃 141001	ZJDH1202-C	河南 140927	甘肃 141107	石柱 141101	四川 141101	甘肃 141101
6	甘肃岷县 141002	山西 14092704	山西 14092702	山西 141101	四川成都 141101	贵州 141110	甘肃 141106
7	甘肃岷县 140619	河南 141104	河南 HN-1	内蒙古 141105	重庆 141106	四川 141109	甘肃 141004
8	甘肃岷县 130811	同仁堂 141118	陕西 SX-5	山西运城 131122	四川雅安 131120	四川雅安 120310	陇西 140317
9	甘肃 140701	河南 141106	陕西 SX-1	山西 141103	石柱 141103	雅安 131120	甘肃 141005
10	汇川 141006	山西 141111	陕西 SX-2	同仁堂 141118	四川 140902	四川 141112	甘肃 141009

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 参照古方的记载,结合传统煎药习惯和临床经验,制备当归六黄汤古代标准汤剂。按当归六黄汤复方剂量(当归 6 g,地黄 6 g,熟地黄 6 g,黄芩 6 g,黄连 6 g,黄柏 6 g,黄芪 12 g)称取各味药材,置陶瓷煎药锅内,加水 1.2 L,直接加热煎煮 90 min,趁热滤过双层纱布,量取体积,取 20 mL 煎煮液,60 ℃ 旋蒸蒸干,用 80% 甲醇定容至 50 mL 量

瓶,滤过,即得。

2.2 色谱条件 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪,Agela Venusil XBP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5.0 μm),流动相乙腈-0.3% 甲酸水溶液梯度洗脱(0 ~ 10 min,5% ~ 15% 乙腈;10 ~ 15 min,15% ~ 20% 乙腈;15 ~ 35 min,20% ~ 25% 乙腈;35 ~ 50 min,25% ~ 31% 乙腈;50 ~ 62 min,31% ~ 55% 乙腈;62 ~ 70 min,55% ~ 60% 乙腈;70 ~ 75 min,

60% ~ 70% 乙腈), 柱后平衡 5 min, 柱温 30 ℃, 体积流量 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。

2.3 质谱条件 Agilent6320 型电喷雾离子阱质谱仪, 离子源电喷雾 (ESI), 扫描范围 m/z 50 ~ 2 200, 干燥气氮气, 体积流量 12 L·min⁻¹, 干燥气温度 350 ℃, 离子检测模式全扫描检测, 离子极性正、负离子, 扫描时间 0.5 s, 碎裂电压 135 V, 增加电压 400 V。

2.4 当归六黄汤汤剂 HPLC 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 按 2.1 项下方法制备当归六黄汤供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件重复进样测定 6 次。结果各色谱峰的相似度均 > 0.99, 符合指纹图谱的要求, 说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 按 2.1 项下方法制备当归六黄汤供试品溶液, 并在制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样测定, 记录色谱图。结果显示, 各色谱峰的相似度均 > 0.99, 符合指纹图谱的要求, 认为供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 按 2.1 项下方法平行制备 6 份当归六黄汤供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件下进样测定, 结果显示各色谱峰的相似度均 > 0.99, 符合指纹图谱的要求, 认为该方法重复性良好。

2.5 当归六黄汤汤剂 LC-MS 图谱 按 2.1 项下方法制备当归六黄汤供试品溶液, 按 2.3 项下质谱条件进样测定, 得到当归六黄汤汤剂的正负离子条件下的图谱。

2.6 当归六黄汤汤剂 HPLC 指纹图谱共有模式的建立 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件, 以 S1 号样品的指纹图谱为保留时间参考标准, 选取峰面积较大且较稳定, 分离度好的 13 号色谱峰作为内参照峰, 对 10 批当归六黄汤汤剂样品 (样品编号为 1 ~ 10) 的色谱指纹峰进行匹配, 结果见图 1 ~ 3。

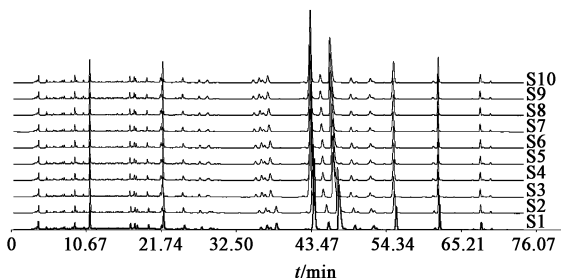


图 1 当归六黄汤样品 HPLC 指纹谱叠加
Fig.1 Danggui Liuhuang Tang HPLC fingerprint samples overlay

2.7 当归六黄汤 LC-MS 分析 通过质谱分析, 得到了各个色谱峰在负离子模式下和在正离子模式下

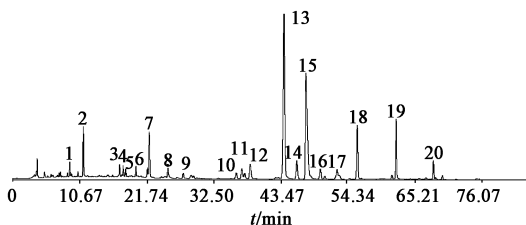
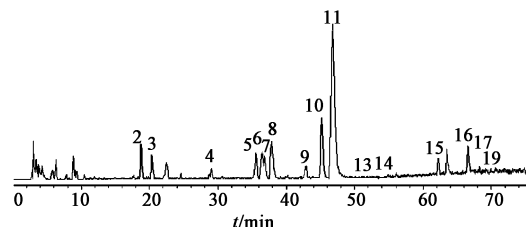


图 2 当归六黄汤样品 HPLC 指纹谱共有模式
Fig.2 Danggui Liuhuang Tang sample HPLC fingerprint mode



1. 黄柏碱; 2. 表小檗碱; 3. 黄连碱; 4. 黄芩苷; 5. 巴马汀; 6. 小檗碱; 7. 千层纸素 A 苷; 8. 汉黄芩苷
图 3 当归六黄汤汤剂对照品 HPLC 谱
Fig.3 Danggui Liuhuang Tang reference HPLC fingerprint

的质谱信息, 进而来确定各个化合物的相对分子质量。通过与七味中药材的保留时间和质谱信息进行对照, 再结合文献的信息, 最终指认出了 19 个色谱峰所对应的化合物, 结果见图 4, 5 和表 2。

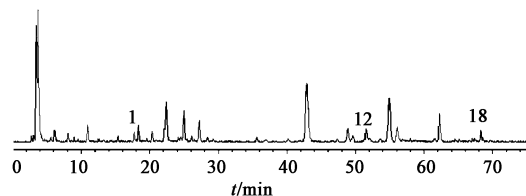


图 4 当归六黄汤汤剂 LC-MS 正离子模式谱
Fig.4 Danggui Liuhuang Tang of LC-MS positive ion mode map

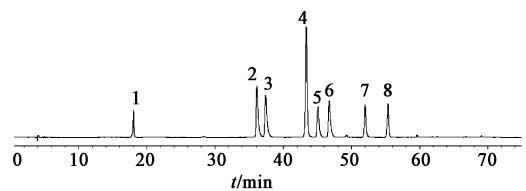


图 5 当归六黄汤汤剂 LC-MS 负离子模式谱
Fig.5 Danggui Liuhuang Tang of LC-MS negative ion mode map

3 讨论

本试验结合传统煎药习惯和临床经验, 针对古代经典方剂如何转化为现代煎煮方法, 进行了分析研究, 得到了质量稳定并且符合古代煎煮方法的标准汤剂, 为经典方剂可以规模化生产打下基础。

经典方剂由多味药组成, 其药效是通过多种活性物质同时发挥作用而实现的, 因此单一成分或单味药的检测, 难以全面控制制剂的内在质量, 所以要

表 2 当归六黄汤汤剂的 HPLC-MS 数据

Table 2 Danggui Liu Huang Tang HPLC-MS data

峰号	t_R /min	负离子模式		正离子模式		分子式	化合物
		MS ¹	MS ²	MS ¹	MS ²		
1	17.8	353	191			C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 ^[8]
2	19.1			342	192	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	黄柏碱 ^[9]
3	20.5			342	297	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	木兰花碱 ^[10]
4	29.2			322	307	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	格陵兰黄连碱 ^[11-12]
5	35.5			338	322	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	药根碱 ^[13]
6	35.9			338	323	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	非洲防己碱 ^[10]
7	36.4			338	320	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	表小檗碱 ^[14]
8	37.7			320	292	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	黄连碱 ^[15]
9	42.8			445	269	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷 ^[16]
10	45.5			352	336	C ₂₁ H ₂₁ NO ₄	巴马汀 ^[17]
11	49.2			336	320	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	小檗碱 ^[17]
12	51.4	445	269			C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷
13	52.0			285	270	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	千层纸素 A 苷 ^[18]
14	54.6			459	283	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	汉黄芩苷 ^[18]
15	62.2			269	251	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	黄芩素 ^[18]
16	67.1			225	91	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	senkyunolide ^[8]
17	68.2			285	270	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	汉黄芩素 ^[18]
18	68.5	253				C ₁₅ H ₁₀ O ₄	白杨素 ^[19]
19	69.6			285	241	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	calycosin ^[20]

控制中药的功效,不仅只针对某几种化学成分,必须对方剂的物质群整体予以控制^[21]。该方中含有七味中药材,单味药材质量的优良直接影响到标准汤剂的质量,因此在确保单味药材质量合格的前提下,选取 10 批不同产地批次的药材,随机组合配伍,制备了 10 批标准汤剂,按供试品指纹图谱检测方法,对 10 批标准汤剂的指纹图谱进行了检测,结果 1 ~ 10 批样品与对照图谱相似度,分别为 0.876, 0.886, 0.910, 0.909, 0.909, 0.909, 0.812, 0.815, 0.823, 0.823。10 批标准汤剂指纹图谱与对照图谱比较,相似度均 > 0.8。不同产地药材品质不同,在药材质量合格的前提下,对标准汤剂的影响不明显,从而确保了标准汤剂质量的稳定。

为使标准汤剂更加接近古代方剂的煎煮,本试验应用高效液相指纹图谱技术以及液质联用技术,通过建立当归六黄汤汤剂的 LC-MS 图谱,指认汤剂中的 19 个特征色谱峰。并且本试验对影响分析方法建立的关键条件进行了考察,并通过建立完善全面的药材质量保证体系,确保了当归六黄汤汤剂质量的稳定,为制订当归六黄汤的质量标准提供了科

学依据,为全面评价当归六黄汤的质量奠定了基础。

[参考文献]

[1] 傅晓芸. 当归六黄汤治疗甲状腺功能亢进症 42 例[J]. 新中医, 1999, 31(6): 47-48.

[2] 周铭. 当归六黄汤加减治疗甲状腺功能亢进体会[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(3): 172-173.

[3] 张晓枝. 当归六黄汤加丙基硫氧嘧啶治疗甲状腺功能亢进症疗效观察[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 24(6): 73-74.

[4] 吴昌安. 当归六黄汤联合西医常规疗法治甲状腺功能亢进症 36 例[J]. 江西中医药, 2010, 41(6): 44-45.

[5] 张良军. 当归六黄汤加丙基硫氧嘧啶治疗甲状腺功能亢进症的临床研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(16): 142-143.

[6] 张伯兴, 王慎娥. 新加当归六黄汤治疗原发性干燥综合征 40 例[J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(6): 434-434.

[7] 李德伟. 加味当归六黄汤治疗白塞病 36 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2001, 17(3): 3.

[8] Li W X, Tang Y P, Qian Y F, et al. Comparative analysis of main aromatic acids and phthalides in Angelicae Sinensis Radix Chuanxiong Rhizoma and Fo-Shou-San by

- avalidated UHPLC-TQ-MS/MS [J]. J Pharmaceut Biomed, 2014, 99(10): 45-50.
- [9] Peng C C, Wang S P, Jin H Z, et al. Bioanalysis and pharmacokinetics of eight active components from Huanglian Jiedu decoction in rat plasma by LC-ESI-MS/MS Method [J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(3): 198-210.
- [10] 郭锦明, 王跃飞, 胡丽萍, 等. 黄连生物碱的 HPLC-MS 分析 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 110-113.
- [11] Ma C H, Li Z X, Wang L X, et al. Identification of major alkaloids in rat urine by HPLC/DAD/ESI-MS/MS method following oral administration of Cortex Phellodendri decoction [J]. Helv Chim Acta, 2009, 92(2): 379-398.
- [12] Chen J H, Wang F M, Liu J, et al. Analysis of alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by accelerated solvent extraction combined with ultra performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and tandem mass spectrometry detections [J]. Ana Chim Acta, 2008, 613(2): 184-195.
- [13] Kukula-Koch W, Mroczek T. Application of hydrostatic - CCC-TLC-HPLC-ESI-TOF-MS for the bioguided fractionation of anticholinesterase alkaloids from *Argemonemexicana* L. roots [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(9): 2581-2589.
- [14] Kukula-Koch W, Mroczek T. Application of hydrostatic CCC-TLC-HPLC-ESI-TOF-MS for the bioguided fractionation of anticholinesterase alkaloids from *Argemone mexicana* L. roots [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(9): 2581-2589.
- [15] Wu W, Song F R, Yan C Y, et al. Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI-FT-ICR-MS and HPLC-ESI-MSⁿ [J]. J Pharmaceut Biomed, 2005, 37(3): 437-446.
- [16] 徐杨璐, 赵胜男, 刘素丽, 等. 液质联用法测定不同贮存期黄芩中 6 种黄酮类化合物含量 [J]. 医药导报, 2015, 34(7): 955-958.
- [17] 马冰. 赤芍、大黄和黄柏中化学成分提取分离及结构鉴定研究 [D]. 长春: 长春师范大学, 2014.
- [18] 王丹, 张秋燕, 徐风, 等. 中药黄芩 HPLC 指纹图谱的化学轮廓及其影响因素的研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(5): 96-102.
- [19] 陈佩东, 徐丹洋, 李芳, 等. UPLC-MS 法分析黄芩炮制前后化学成分变化 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 784-788.
- [20] Liu J, Hu X G, Yang Q, et al. Comparison of the Immunoregulatory Function of Different Constituents in Radix Astragali and Radix Hedysari [J]. J Biomed Biotech, 2010, 1155(10): 1-12.
- [21] 郑恒, 魏日胞, 陈香美. 中药质量标准与中药指纹图谱 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(2): 112-113.

[责任编辑 顾雪竹]